GENERIC HIV CHARGE VIRALE

Test d'amplification d'acides nucléiques pour quantification de l'ARN du VIH-1.

REF	Σ	IVD
TR001-250	**220** tests	
TR001-440	**440** tests	

UTILISATION

GENERIC HIV CHARGE VIRALE est un test *in vitro* d'amplification des acides nucléiques qui permet la détection et la quantification de l'ARN du VIH-1 dans les prélèvements de plasma humain.
GENERIC HIV CHARGE VIRALE, test de RT-PCR en temps réel (ciblant le gène LTR du VIH-1) est destiné à être utilisé pour:
- Le diagnostic pédiatrique précoce de l'infection VIH-1 pour les enfants âgés de moins de 18 mois.
- Le suivi des patients sous traitement antirétroviral.

CONTEXTE

Les virus de l'immunodéficience humaine (VIH), responsables du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), ont été identifiés à l'Institut Pasteur en 1983 pour le VIH-1 et en 1986 pour le VIH-2, alors que les premières descriptions cliniques de SIDA dataient de 1981. Ces virus sont proches des rétrovirus de singe isolés chez différentes espèces. Ils appartiennent à la famille des Retroviridae, genre Lentivirus, aux côtés de virus animaux comme le virus Visna, responsable d'une maladie chez les ovins. Ils sont en revanche différents des autres rétrovirus humains que sont les HTLV-1 et HTLV-2 (human T-cell leukemia virus), classés dans le genre oncovirus.
Les VIH sont des virus enveloppés de 90 à 120 nm de diamètre. L'enveloppe entoure une nucléocapside (ou core) qui protège deux molécules identiques d'ARN monocaténaire de 9 Kb, associées à une transcriptase inverse (ou reverse transcriptase ou RT),et une intégrase, enzymes nécessaires à la transcription de l'ARN rétroviral en ADN proviral capable de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte.
Deux virus VIH (VIH1 et VIH2) ont été identifiés à ce jour. L'étude de leur variabilité génétique et de celle de leurs homologues simiens a permis de mieux les caractériser:
- Les VIH1 sont répartis en un groupe M (Majeur), rassemblant les sous-types A à K, le groupe O (Outlier) et le groupe N. Le groupe M est présent sur toute la planète mais la répartition géographique des sous-types n'est pas homogène.
S'ajoutent à ces sous-types plus de 30 formes virales recombinantes (CRF ou circulating recombinant forms) issues de recombinaisons entre différents sous-types. Certaines de ces CRF (CRF01 AE et CRF02 AG) sont responsables de véritables épidémies en Afrique de l'Ouest et en Asie.

En l'absence de traitement, l'infection par le VIH-1 est caractérisée par une phase aiguë précoce présentant une virémie élevée, et qui conduit à une phase clinique asymptomatique de durée variable qui précède l'immunodéficience (Levy, Pantaleo). Durant toute l'infection, un nombre extraordinairement élevé de cycles de réplication virale a lieu, et cette forte capacité réplicative du VIH-1 conduit à la fois à la formation de pools génétiquement variés et à des charges virales élevées (Coffin, Ho).

Bien que le cours de l'infection à VIH-1 soit extrêmement variable, son issue ne l'est pas. Presque tous les patients infectés par le VIH-1 meurent des suites du SIDA dans les 2 à 20 ans qui suivent la primo-infection. L'évolution de la maladie a pu être ralentie ces dernières années grâce au nouvel apport de puissants traitements antirétroviraux. Néanmoins, la capacité du VIH-1 à développer des résistances représente un obstacle majeur à l'efficacité à long terme des thérapies médicamenteuses anti-VIH (Japour, Larder, Shafer).

La concentration d'ARN du VIH-1 dans le plasma des patients infectés par le VIH-1 est un indicateur pronostique important de l'issue de la maladie et un marqueur de l'efficacité des traitements anti-rétroviraux (Hughes, Mellors, O'Brien). Un traitement est généralement initialement admis comme efficace lorsqu'il entraîne une diminution de la charge virale à des taux inférieurs à 50 copies/ml. Néanmoins, même dans ce cas, la réussite à long terme d'un traitement n'est pas garantie car une réapparition des phénomènes de résistance peut intervenir, signifiant que la réplication du VIH-1 et son évolution peuvent persister alors que le patient est sous traitement.

La charge virale est la quantité de virus présente dans le sang: elle correspond à la quantification des particules virales présentes dans le plasma. Les données récentes mettent en évidence l'importance croissante des tests VIH de charge virale pour les soins apportés aux personnes infectées par le VIH.
1. Des mesures de charge virale effectuées aux stades précoces de l'infection à VIH permettent de prédire la progression vers le sida.
- Les personnes infectées qui ont une faible charge virale qui augmente lentement restent habituellement plus longtemps en bonne santé.
- Le risque d'infection périnatale (d'une mère infectée au foetus) est augmenté chez les femmes dont la charge virale est élevée.
- La mesure de charge virale et la numération des CD4+ font ensemble un meilleur indicateur de la progression de la maladie que la numération CD4+ seule.
2. La détection de la charge virale dans le plasma des nouveau-nés de mères séropositives est révélatrice de l'infection à VIH-1 chez les enfants.

Un traitement est généralement accepté comme efficace lorsque la charge virale est réduite à des niveaux inférieurs à 50 copies/mL. Cependant, même dans ce cas, le succès à long terme d'un traitement n'est pas garanti puisque les phénomènes de résistance peuvent se reproduire ; ce qui signifie que la réplication du VIH-1 et son évolution peuvent persister pendant que le patient est sous traitement.
En plus d'être un bon outil pronostique, les tests de la charge virale reflètent l'efficacité des traitements antirétroviraux. Une baisse de la charge virale indique qu'un médicament donné a obtenu une suppression de la réplication du VIH, du moins à un certain degré. Si un médicament particulier n'amène pas de suppression de la charge virale, un autre traitement serait probablement à envisager.

PRINCIPE DU TEST

Le kit GENERIC HIV CHARGE VIRALE développé au sein de l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS) est un test de PCR en temps réel pour la détection quantitative du virus VIH-1 dans le plasma humain. La PCR en temps réel permet d'obtenir une quantification précise des produits de PCR pendant la phase exponentielle du processus d'amplification. Grâce à la détection en temps réel du signal fluorescent pendant et/ou après chaque cycle PCR, les données de PCR quantitative peuvent être obtenues dans un délai très bref. Ainsi, aucun traitement post-PCR n'est requis, ce qui entraîne non seulement une diminution considérable du risque de contamination du produit de PCR, mais permet également d'éviter d'ultérieures contaminations d'échantillons par des amplicons produits lors de réactions antérieures.

Le test GENERIC HIV CHARGE VIRALE exploite le principe de RT-PCR par hydrolyse d'une sonde nucléotidique doublement marquée avec un groupement 5' *reporter* fluorescent (FAM™) et un groupement 3' *quencher* (MGB). Pendant la PCR, les amorces sens et anti-sens s'hybrident à une séquence spécifique au niveau des amplicons. La sonde contenue dans le même mélange réactionnel s'hybride à une séquence cible de l'amplicon. Lorsque la sonde est intacte, la proximité spatiale entre le reporter et le *quencher* inhibe la fluorescence du *reporter* principalement par un transfert d'énergie de type Förster (Förster, 1948; Lakowicz, 1983). Pendant la PCR, la sonde se fixe spécifiquement entre les deux sites où sont hybridées les amorces sens et anti-sens et inhibe toute activité polymérase de la Taq polymérase, mais active sa fonction 5´-3´ exonucléase qui clive la sonde entre le reporter et le quencher. Le reporter, libéré du quencher, émet un signal fluorescent enregistré en temps réel par des capteurs. Ainsi débarrassée des fragments de sonde, la séquence cible peut être lue et polymérisée par la Taq Polymérase.
L'augmentation du signal de fluorescence est détectée seulement si la séquence cible est complémentaire à la sonde et si elle est amplifiée pendant la PCR. Ainsi, une amplification non spécifique ne peut pas être détectée. Grâce à ce principe réactionnel, l'augmentation de fluorescence est directement proportionnelle à l'amplification de la cible pendant la PCR.
L'évolution de l'amplification est représentée par une courbe d'allure sigmoïde, pouvant être divisée en deux phases:
1) une phase correspondant à une amplification exponentielle au cours de laquelle la quantité de produit de PCR obtenue à chaque moment est directement fonction du nombre de copies initiales. Au début de la phase d'amplification exponentielle, le moment où le signal sort du bruit de fond correspond à un certain nombre de cycles, appelé Ct (pour *Cycle threshold*)
2) L'amplification exponentielle est suivie d'une phase de plateau qui correspond à un ralentissement de l'amplification, dû à l'épuisement des réactifs.

Le test GENERIC HIV CHARGE VIRALE est un test de détermination de la charge virale chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH-1). Le test repose sur le principe de l'amplification en temps réel de l'ARN rétroviral (cible, gène LTR) présent dans les échantillons plasmatiques.
Le test comprend deux grandes étapes opérationnelles:
1. Préparation de l'échantillon : l'ARN rétroviral est purifié et concentré sur mini-colonnes

2. Dans le même tube, transcription de l'ARN rétroviral en ADN puis amplification de l'ADN ainsi généré.
Chaque série de tests inclut une gamme d'échantillons standards calibrés qui permet de tracer une droite d'étalonnage, Ct *versus* $\log_{10}$ [Quantité de virus]. La charge virale de chaque échantillon testé est obtenue en extrapolant de cette droite la charge virale correspondant à la valeur Ct de l'échantillon.

Le test GENERIC HIV CHARGE VIRALE peut être réalisé selon deux protocoles :
- Un protocole classique présentant un seuil de sensibilité de 300 copies/mL.
- Un protocole ultra-sensible présentant un seuil de sensibilité jusqu'à 7 fois plus bas, mais nécessitant un volume d'échantillon plus important (vol.=1 mL). Ce protocole peut notamment être utilisé pour la mise en évidence d'un processus de réplication résiduelle ou chez les patients présentant une antériorité de charge virale inférieure à 1000 copies/mL.

Les références respectives (TR001-250 et TR001-440) du kit GENERIC HIV CHARGE VIRALE permettent de tester jusqu'à 180 ou 360 échantillons de patients.

COMPOSITION DE LA TROUSSE

Réactifs composant le kit :

Désignation des réactifs	Quantité		Conservation
Réactifs d'amplification	**TR001-250**	**TR001-440**	
Mix enzymatique 4X : Transriptase inverse et DNA polymérase avec ROX™ comme référence passive, équilibrées dans un tampon ne congelant pas à -20°C. *****	2 x 0,6 mL	4 x 0,6 mL	- 30°C / -18°C
Amorce A : Amorce sens de 18 nucléotides (nt)	1 x 0,125 mL	2 x 0,125 mL	- 30°C / -18°C
Amorce B : Amorce anti sens de 21 nt	1 x 0,125 mL	2 x 0,125 mL	- 30°C / -18°C
Sonde C : Sonde TaqMan® (15 nt) avec comme « reporter » le fluorophore FAM™ en 5' et le "quencher" non fluorescent MGB en 3'.	1 x 0,125 mL	2 x 0,125 mL	- 30°C / -18°C
Standards HIV-1 RNA (UI/mL)**	**TR001-250**	**TR001-440**	
1E7: particules virales VIH-1 inactivées à 10^7 UI/mL	1 x 1,2 mL	2 x 1,2 mL	- 30°C / -18°C
1E6: particules virales VIH-1 inactivées à 10^6 UI/mL	1 x 1,2 mL	2 x 1,2 mL	- 30°C / -18°C
1E5: particules virales VIH-1 inactivées à 10^5 UI/mL	1 x 1,2 mL	2 x 1,2 mL	- 30°C / -18°C
1E4: particules virales VIH-1 inactivées à 10^4 UI/mL	1 x 1,2 mL	2 x 1,2 mL	- 30°C / -18°C
1E3: particules virales VIH-1 inactivées à 10^3 UI/mL	1 x 1,2 mL	2 x 1,2 mL	- 30°C / -18°C
Contrôles	**TR001-250**	**TR001-440**	
CONTROL+ (HIV-1 RNA): particules virales VIH-1 inactivées.	1 x 1,2 mL	2 x 1,2 mL	- 30°C / -18°C
CONTROL-: plasma (EDTA) normal humain.	1 x 1,2 mL	2 x 1,2 mL	- 30°C / -18°C

***** Pour le réactif Master Mix 4X conservé à -20°C, un e gélification peut apparaître.
****** Les standards et le contrôle positif sont obtenus en fabriquant des dilutions titrées d'une source de culture de VIH-1 de sous-type B dans une matrice de plasma (EDTA) normal humain (PNH).
Cette matrice PNH a été préalablement testée et trouvée négative pour : ADN VHB, ARN VHC, ARN VIH-1, anticorps anti-VIH-1/ VIH-2, VHC, HTLV I-II et Ag HBs.
La matrice PNH est utilisée pour produire le réactif CONTROL-.
Les réactifs standards et contrôles contiennent comme conservateurs, 0,05% d'azide de sodium et 0,05% de sulfate de gentamicine.

Note : Le facteur de conversion appliqué entre la mesure de l'ARN VIH-1 reportée en nombre de copies/mL et celle en UI/mL est 2 UI/ copie.

STOCKAGE DES REACTIFS

A réception, le coffret doit être immédiatement stocké à -30/-18°C.
Conservés dans ces conditions, les réactifs du coffret sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur chaque étiquette.
Précautions:
- Les 5 standards et le contrôle positif peuvent être recongelés après la première utilisation, décongelés une fois et utilisés une seconde fois sans perte des titres.
- Cependant, après la première utilisation, il est recommandé de préparer des aliquotes de 0,2 mL en microtubes stériles "nuclease free"; fermer les tubes avec les bouchons appropriés et les étiqueter soigneusement en indiquant le nom du réactif, le lot et la date de péremption.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes calibrées 1-10 µL, 20-200 µL et 100-1000 µL
- Embouts de pipettes avec filtre pour pipette 1-10 µL, 20-200 µL et 100-1000 µL
- Pipettes Pasteur en plastique graduées.
- Eau distillée pour Biologie Moléculaire.
- Kit d'extraction QIAamp® Viral RNA Mini kit - Qiagen® (ref 52906)
- Centrifugeuse de paillasse (jusqu'à 14000 rpm)
- Thermocycleur pour PCR en temps réel
- Chronomètre
- Gants à usage unique
- Microtubes 2 mL
- Microtubes stériles 0,2 mL Nuclease free
- Microplaque 96 puits et film adhésif
- Ethanol (96 - 100%)

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- GENERIC HIV CHARGE VIRALE est un test exclusivement réservé à être utilisé par du personnel de laboratoire qualifié en BPL de biologie, conscient des risques biologiques et formé à l'analyse en biologie moléculaire. L'interprétation des résultats obtenus à partir de ce test est de la responsabilité du biologiste chef de laboratoire ou d'un technicien de laboratoire dûment autorisé.
- Ce test doit être utilisé uniquement pour l'analyse de plasma humain prélevé exclusivement sur un anticoagulant de type EDTA ou ACD. En effet, l'héparine inhibe la réaction de PCR et ne doit pas être utilisée avec cette méthode.
- Des différences dans le traitement des échantillons et dans les procédures techniques peuvent conduire à des résultats ininterprétables.
- Pour toute manipulation, porter des gants et revêtir une blouse de laboratoire. Le port de lunettes de sécurité est fortement recommandé pour la manipulation des échantillons de plasma et des composants du kit présentant un potentiel risque biologique.
- Ne pas manger ni boire ni fumer dans les différentes zones de travail du laboratoire.
- Ne jamais pipeter les réactifs à la bouche.
- Eviter les contacts avec la peau et les muqueuses.
- Si les réactifs ou les échantillons entrent en contact avec la peau ou les yeux, laver abondamment avec une grande quantité d'eau et contacter un médecin si une irritation se développe.
- Utiliser des nouveaux cônes aérosol résistants pour éviter les contaminations croisées entre les échantillons et les réactifs.
- Utiliser des consommables « nuclease-free » (ex. pipettes, cônes, tubes).
  Les échantillons de plasma doivent être manipulés comme si ils étaient capables de transmettre des infections et éliminés comme tels. Ils nécessitent les précautions d'usage, telles celles décrites dans Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories Laboratories (BMBL)*****
  * Pour plus d'information sur la publication BMBL, consulter le site web du CDC à: www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL.pdf.
- Le contrôle positif et les cinq standards doivent être considérés comme des composants potentiellement infectieux et donc manipuler avec les mêmes précautions que les échantillons de plasma.
- Nettoyer et désinfecter soigneusement tous les plans de travail avec une solution préparée extemporanément à 0,5% d'hypochlorite de sodium dans de l'eau déminéralisée ou distillée.
- Après chaque essai, les consommables (et déchets) doivent être considérés comme contaminés et traités avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5% ou tout autre agent d'inactivation.
- Se laver soigneusement les mains après toutes manipulations.
- Les réactifs et les instructions fournies dans ce kit ont été validés pour des performances optimales. Des dilutions additionnelles des réactifs ou des changements dans les températures d'incubation peuvent entraîner des résultats erronés ou discordants.
- Tous les réactifs ont été spécialement formulés pour être utilisés dans ce test de PCR quantitatif. Aucune substitution ne doit être faite pour une performance optimale de ce test.
- Les composants de ce kit sont testés comme une seule association ; ne pas mélanger les réactifs de lots différents.
- La qualité de l'amplification dépend aussi de la qualité de l'extraction de l'ARN et de sa préservation. Utiliser de préférence la technique d'extraction recommandée ; ne pas utiliser des réactifs d'extraction au-

delà de la date de péremption indiquée.
- Eliminer les réactifs non utilisés, les déchets et les échantillons testés selon la réglementation en vigueur dans le pays aux niveaux local, régional et national.
- Ne pas utiliser le kit au-delà de sa date de péremption.

PRELEVEMENT, TRANSPORT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Prélèvement plasmatique et stockage

- Considérer tous les échantillons comme potentiellement infectieux et les manipuler en respectant les règles établies et en vigueur au niveau local, régional ou national.
- Le sang doit être prélevé dans des tubes stériles, avec l'EDTA ou ACD comme anti-coagulant. Conserver le sang total au maximum 6 heures entre +2° et +25°C. Centrifuger à 800-1600g à tempé rature ambiante pendant 20 minutes. Transférer le plasma dans un tube stérile.
- Les échantillons de plasma ainsi préparés peuvent être conservés soit à température ambiante pendant un jour, soit à -20°C pour des durées plus longues. Un échantillon de plasma peut être congelé et décongelé une fois afin de limiter une baisse de titre viral et par conséquent la réduction du rendement en ARN extrait.
- Avant de débuter l'extraction de l'ARN, clarifier les échantillons de plasma par centrifugation 5 minutes à 450 rpm.

Préparation de l'échantillon de plasma pour l'isolement de l'ARN

L'échantillon peut être traité et l'ARN viral isolé soit par un protocole classique, soit par un protocole ultrasensible.

Protocole classique

L'extraction de l'ARN viral est effectuée en routine à partir de 200 µL de plasma.

Protocole ultrasensible

L'extraction de l'ARN viral peut être effectuée à partir d'un volume plus important de plasma.

- Centrifuger 1 mL de plasma dans un tube de type Eppendorf 1,5 mL à 17000 rpm pendant une heure à 4°C.
- Reprendre le culot dans 140 µL de RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) et vortexer vigoureusement pour une remise en suspension complète. Conserver à +2/+8°C en vue de l'extraction.

EXTRACTION DE L'ARN RETROVIRAL

Le protocole d'extraction décrit ci-après est un résumé modifié du protocole d'extraction QIAamp Viral RNA Mini kit. Pour des informations plus complètes, se reporter au manuel d'utilisation original.

Conservation

Les colonnes QIAamp, les tampons et les réactifs peuvent être conservés au sec et à température ambiante (+15 à +25°C) jusqu'à la date de péremption indiquée sur la boîte du kit, sans altération de leurs performances. Toutes les solutions sont conservées à température ambiante, sauf contre-indication spécifique. Eviter la conservation à des températures plus élevées.

Limites d'utilisation

Le kit QIAamp Viral RNA Mini est dédié aux applications de biologie moléculaire. L'usage de ce produit n'est pas destiné à une application clinique (diagnostic, pronostic ou thérapeutique). Toutes les précautions nécessaires doivent être prises pour la manipulation des produits. Il en va de la responsabilité de l'utilisateur de valider la performance des kits QIAamp pour toute application particulière, les caractéristiques de ces kits n'ayant pas été définies à l'origine pour un usage spécifique. Il est recommandé d'utiliser les produits QIAGEN en suivant les directives du NIH* établies pour les expériences liées à l'ADN recombinant, ou autres directives applicables. Les kits QIAamp peuvent être utilisés en diagnostic clinique après validation des procédures complètes par le laboratoire conformément aux règles du CLIA'88 (Etats-Unis), ou équivalentes dans d'autres pays.

* Pour plus d'information, consulter le site web OBA à:
http://oba.od.nih.gov/oba/rac/Guidelines/NIH_Guidelines.pdf

Remarques préliminaires importantes

- Toutes les étapes des protocoles QIAamp Viral RNA Mini doivent être effectuées rapidement et à température ambiante.
- Après prélèvement et centrifugation, le plasma se conserve jusqu'à 6 heures à +2/+8°C. Pour une conservation de longue durée, il est préférable d'aliquoter l'échantillon et de le congeler entre -20°C et -80°C. Ne pas décongeler les échantillons de plasma plus d'une fois. Les cycles de congélation/décongélation successifs entraînent une dénaturation et une précipitation des protéines, conduisant à une réduction du titre viral. Par conséquent, le rendement en ARN viral en sera réduit. De plus, les cryoprécipités formés par la congélation/décongélation risquent d'obstruer la membrane QIAamp. Si des cryoprécipités sont visibles, les culotter par une centrifugation de 3 minutes à 6800 x g. Prélever le surnageant clarifié, sans toucher au culot, et poursuivre la purification. Cette étape ne réduira pas les titres viraux.
- Les kits QIAamp n'ont pas été développés pour séparer l'ARN de l'ADN.
- Le procédé QIAamp ARN viral permet de purifier toutes les molécules d'ARN d'une taille supérieure à 200 nucléotides. Les molécules de taille inférieure ne se fixeront pas de manière significative sur la membrane dans les conditions utilisées.

Préparation des réactifs

Addition d'ARN entraîneur au tampon AVL

- Bien dissoudre l'ARN entraineur lyophilisé dans 310 µL de tampon AVE. Après dissolution dans le tampon AVE, le RNA carrier/ AVE doit être conservé à -20°C. Il ne doit pas être congeler -décongeler plus de 3 fois.
- Si nécessaire, dissoudre les précipités éventuels présents dans le tampon AVL en l'incubant à 80°C. Préparer la soluti on AVL avec l'ARN entraineur/AVE en calculant le volume ARN entraineur/AVE nécessaire selon le nombre de tubes à extraire (voir Tableau ci-dessous). La procédure est optimale pour 8 µg équivalent à 8 µL d'ARN entraîneur par échantillons (200 µL). La solution AVL-ARN entraineur est stable à +4°C pendant plus de 48 heures. Au cours de la conservation entre 2 et 8°C, la solution de tampon AVL/ARN entraîneur peut former un précipité. Si nécessaire le dissoudre en chauffant la solution à +80°C avant utilisation .

  Précautions : Ne pas chauffer la solution de tampon AVL/ARN entraîneur plus de 6 fois. Ne pas incuber à +80°C plus de 5 minutes. C hauffer fréquemment et prolonger l'incubation peut provoquer une dégradation de l'ARN entraineur, une baisse de rendement en ARN purifié, voire l'apparition de faux négatifs en RT-PCR. Ceci est particulièrement critique dans le cas de faibles charges virales.

Tab. : Volumes de tampon AVL et mélange ARN entraîneur / tampon AVE nécessaires pour un protocole QIAamp Viral RNA Mini adapté à un volume d'échantillon plasmatique de 200 µL

Nombre d'échantillons	Volume de tampon AVL (mL)	Volume d'ARN Entraîneur AVE (µL)
1	0,8	8
2	1,6	16
3	2,6	26
4	3,2	32
5	4,0	40
6	4,8	48
7	5,6	56
8	6,4	64
9	7,2	72
10	8,0	80
11	8,8	88
12	9,6	96
13	10,4	104
14	11,2	112
15	12,0	120
16	12,8	128
17	13,6	136
18	14,4	144
19	15,2	152
20	16,0	160
21	16,8	168
22	17,6	176
23	18,4	184
24	19,2	192

Tampon AW1 et tampon AW2

- Le tampon AW1 est livré sous forme concentrée. Avant de l'utiliser pour la première fois, ajouter 125 ml d'éthanol (96 à 100%) au 95 ml de tampon AW1 contenu dans le flacon.
- Le tampon AW1 ainsi préparé et conservé dans son flacon d'origine fermé est stable 1 an à température ambiante.
- Le tampon AW2 est livré sous forme concentrée. Avant de l'utiliser pour la première fois, ajouter 160 ml d'éthanol (96 à 100%) au 66 ml de tampon AW2 contenu dans le flacon.
- Le tampon AW2 ainsi préparé et conservé dans son flacon d'origine fermé est stable 1 an à température ambiante.

Utilisation des colonnes QIAamp (QIAamp spin columns)

En raison de la sensibilité des technologies d'amplification d'acides nucléiques, il est nécessaire de prendre les précautions suivantes lors de l'utilisation des colonnes QIAamp afin d'éviter toute contamination croisée entre les préparations d'échantillons:

- Transférer avec précaution l'échantillon sur la colonne QIAamp. Déposer l'échantillon dans la colonne sans en mouiller le bord.
- Changer les embouts de pipette entre chaque étape de transfert de liquide. Il est recommandé d'utiliser des cônes à filtre.
- Eviter de toucher la membrane QIAamp avec l'embout de la pipette.
- Après toutes les étapes d'homogénéisation par vortex, centrifuger brièvement les microtubes de 1,5 ml afin de récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon.
- Porter des gants pendant toute la procédure. En cas de contact des gants avec l'échantillon changer immédiatement de gants.
- Fermer la colonne QIAamp avant de l'installer dans la microcentrifugeuse. Centrifuger comme décrit (QIAamp Viral RNA

Mini, protocole pour centrifugation (Spin Protocol)).

- Sortir la colonne QIAamp et le tube collecteur de la microcentrifugeuse. Transférer la colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur. Jeter l'effluent et l'ancien tube collecteur. L'effluent peut contenir des déchets dangereux et doit être éliminé correctement.
- Ouvrir seulement une colonne QIAamp à la fois et prendre garde de ne pas générer d'aérosols.
- Pour une manipulation de plusieurs échantillons en parallèle nous recommandons de remplir un portoir avec des tubes collecteurs dans lesquels vous pouvez transférer les colonnes QIAamp après centrifugation. Jeter les tubes contenant l'effluent et installer les nouveaux tubes collecteurs (contenant les colonnes QIAamp) directement dans la microcentrifugeuse.

QIAamp Viral RNA Mini/ Protocole par centrifugation (Spin Protocol)

- Equilibrer les échantillons à température ambiante (+15 à +25°C).
- Vérifier que le tampon AW1, le tampon AW2 et l'ARN entraîneur ont bien été préparés en respectant les instructions ci-dessus.
- Si nécessaire, dissoudre les précipités présents dans le tampon AV1/ARN entraîneur en le chauffant puis le laisser s'équilibrer à température ambiante avant utilisation.
- Les centrifugations doivent être réalisées à température ambiante.

1. Lyse virale

Repérer dans le tableau ci-après les volumes à utiliser selon le protocole employé.

	Protocole classique	**Protocole ultrasensible**
	- Dans un microtube de 2 mL (non fourni) ajouter :	
Tampon AVL avec ARN entraîneur	800 µL	560 µL
Echantillon	200 µL de plasma	140 µL d'échantillon concentré en RPMI
	- Vortex, 15 secondes - Incuber 10 min à température ambiante (15 à 25°C)	

2. Précipitation des acides nucléiques

a/ Ajouter 800 µL d'éthanol (96 à 100%) à l'échantillon et vortexer au moins 15 secondes en renversant plusieurs fois le microtube. Le mélange doit présenter une coloration blanche.

b/ Après homogénéisation, centrifuger rapidement pour récupérer les gouttelettes éventuellement accumulées dans le capuchon.

Utiliser seulement de l'éthanol car d'autres alcools pourraient entraîner un rendement et une qualité d'ARN réduits. Afin d'assurer une capture efficace, il est essentiel de mélanger vigoureusement l'échantillon avec l'éthanol afin d'obtenir une solution homogène.

3. Capture de l'ARN rétroviral

a/ Préparer autant de colonnes QIAamp (fournies sous blister et pré-installées dans un tube collecteur de 2 mL) que d'échantillons à extraire.

b/ A l'aide d'un marqueur, numéroter chaque colonne sur son capuchon.

c/ Déposer avec précaution 600 µL de la solution obtenue à l'issue de la précipitation (étape 2) dans la colonne QIAamp sans en mouiller le bord.

d/ Fermer le capuchon afin d'éviter toute contamination croisée pendant la centrifugation et centrifuger 1 minute à 6000 x g (8000 rpm). A l'issue de la centrifugation, l'ARN rétroviral est capturé sur la colonne, alors que la solution a filtré au travers et se retrouve au fond du tube collecteur.

e/ Transférer la colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur de 2 mL et jeter le tube contenant l'effluent.

f/ Ouvrir la colonne QIAamp avec précaution et répéter les étapes 3.c à 3.e jusqu'à ce que tout le lysat soit déposé sur la colonne.

4. Lavage avec tampon AW1

Ouvrir la colonne QIAamp avec précaution et ajouter 500 µL de tampon AW1. Fermer le capuchon et centrifuger 1 minute à 6000 x g (8000 rpm). Transférer la colonne QIAamp dans un tube collecteur de 2 ml propre (fourni) et jeter le tube contenant l'effluent.

5. Lavage avec tampon AW2

Ouvrir la colonne QIAamp et ajouter 500 µL de tampon AW2. Fermer le capuchon et centrifuger 3 minutes à vitesse maximale (20000 x g ; 14000 rpm).

b/ Transférer la colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur de 2 mL (non fourni), et jeter l'ancien tube collecteur contenant l'effluent. Centrifuger à nouveau 1 minute à vitesse maximale afin d'éliminer toute trace d'éthanol car ce dernier inhibe la réaction d'amplification.

6. Récupération de l'ARN rétroviral

a/ Transférer la colonne QIAamp dans un tube propre de 1,5 mL (non fourni) et jeter l'ancien tube collecteur contenant l'effluent.

b/ Ouvrir la colonne QIAamp avec précaution et déposer au centre du filtre 60 µL d'eau (qualité biologie moléculaire), équilibré à température ambiante, en prenant soin de ne pas toucher la paroi du tube.

c/ Fermer le capuchon et incuber 1 minute à température ambiante. Centrifuger 1 minute à 6000 x g (8000 rpm).

d/ Eliminer la colonne QIAamp et récupérer l'éluat contenant l'ARN viral.

Précaution : l'ARN viral ainsi obtenu doit être conservé à +2/+8°C pour être testé le jour-même, ou conservé -80/-70°C pour être testé ultérieurement.

PREPARATION DES STANDARDS ET DES CONTROLES

Le kit GENERIC HIV CHARGE VIRALE inclut 5 standards VIH-1 de charge virale (de **1E7**, 10^7 UI/mL à **1E3**, 10^3 UI/mL), un contrôle positif et un contrôle négatif.

Extraire l'ARN viral de chaque standard VIH-1 et chaque contrôle comme s'il s'agissait d'un échantillon, en ajoutant 200 µL de standard ou contrôle dans 800 µL de tampon AVL contenant l'ARN entraîneur (voir la section "Extraction" ci-dessus, paragraphes 1 à 6).

Précaution : chaque standard et le contrôle positif contiennent des particules virales potentiellement infectieuses et doivent être manipulés en respectant les règles en vigueur au niveau local, régional ou national pour la manipulation de matériel infectieux.

PREPARATION DE LA REACTION DE PCR

Préparation du mélange réactionnel

Calculer le nombre d'échantillons à tester, sans oublier les cinq standards VIH-1 de charge virale décroissante (1E7, 1E6, 1E5, 1E4 and 1E3), le contrôle positif, le contrôle négatif et un contrôle négatif supplémentaire (ex. eau pour biologie moléculaire).

Dans un microtube stérile de 1,5 ml, préparer le mélange réactionnel suivant pour un échantillon. Pour N échantillons, multiplier par "N+3" tous les volumes indiqués :

Réactif (de biologie moléculaire)	**Volume (µL)**
Amorce A	0,5
Amorce B	0,5
Sonde C	0,5
H_2O	3,5
Mix enzymatique 4X	5,0
volume de réaction total	10,0

1. Préparation de la plaque PCR

- Homogénéiser la solution obtenue en lagitant avec un vortex. Récupérer les éventuelles gouttelettes présentes sur les bords du tube ou dans le capuchon en centrifugeant 1 seconde.
- Répartir dans une plaque PCR ou dans des microtubes adéquats 10 µL de mélange réactionnel obtenu.
- Mélanger au Vortex chaque standard, contrôle ou échantillon pendant au moins 20 secondes puis déposer 10 µL d'échantillon, de standard ou de contrôle dans chaque puits-test de la plaque.
- Fermer soigneusement la microplaque PCR avec le film adhésif approprié.

Note: pour des instructions détaillées concernant un essai de quantification, se référer au manuel d'utilisation spécifique à l'instrument de PCR en temps réel et son logiciel.

2. Installer la plaque de PCR correctement fermée avec son film adhésif dans l'instrument de PCR en temps réel et démarrer l'amplification.

Précaution: à partir de cette étape et jusqu'à élimination de la plaque analysée contenant des cibles amplifiées, ne jamais déplacer ou enlever le film adhésif couvrant la plaque.

3. Effectuer l'essai de PCR en temps réel selon la programmation des paramètres suivants:

Programme d'amplification(*)

Température	**Durée**	**Etape**	**Amplification**
50°C	10 minutes	Transcription inverse	
95°C	5 minutes	Activation de l'enzyme	
95°C	15 secondes	Dénaturation	50 cycles
60°C	1 minute	Hybridation	

(*) Le programme d'amplification a été optimisé sur différents instruments « ouverts » de PCR en temps réel : ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems), Opticon et Mini-Opticon et CFX96 Real-Time systems (Biorad).

L'instrument de PCR en temps réel utilisé pour le test est un système « ouvert » qui possède au moins les caractéristiques principales suivantes :

- effectuer au moins des essais quantitatifs de PCR en temps réel ;
- être équipé d'un bloc de thermocyclage permettant l'utilisation de plaque standard à 96 puits réactionnels ;
- être équipé d'une source d'excitation : LEDs, lampe ou laser ;
- être équipé avec au moins les jeux de filtres (longueurs d'onde Excitation/ Emission) adaptés pour la détection des deux fluorophores: FAM (Ex. 492 nm/ Em. 516 nm) et ROX (Ex. 585 nm/ Em. 610 nm).
- Connectable avec un ordinateur utilisant un logiciel spécifique d'analyse permettant la récupération des données de fluorescence et la conduite des essais de quantification absolue.

A la fin de l'essai d'amplification et lorsque toutes les données de l'analyse sont collectées:

4. Vérifier ou déterminer la valeur seuil de la réaction;
5. Déterminer la valeur Ct (Cycle threshold) de chaque standard de la gamme (intersection entre la droite représentant la valeur seuil et la courbe d'amplification.

CALCUL ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Lorsqu'un logiciel spécifique dédié au système de PCR en temps réel est utilisé, consulter son manuel d'instructions décrivant la saisie des données de l'essai et le mode opératoire du dosage par quantification absolue.
Le logiciel pemet au moins de :
- Choisir le fluorophore ;
- ajuster le seuil ou l'établir automatiquement pour chaque puits-test ;
- reporter la répartition des standards, contrôles et échantillons à tester dans le plan de plaque ;
- construire la droite d'étalonnage utilisée pour le dosage quantitatif ;
- établir la feuille de résultats décrivant les données de chaque puits-test dont : la position du puits, le fluorophore mesuré, l'identification de l'échantillon, la valeur de Ct, la quantité initiale de la cible dans l'échantillon (ex. valeur en copie/mL ou $\log_{10}$ de la quantité).

Précautions:
- Pour la détermination de la charge virale utilisant le protocole ultrasensible (cf. le §/ Préparation de l'échantillon de plasma pour l'isolement de l'ARN) diviser la valeur obtenue par le coefficient ci-après :
Volume de plasma de départ *****
200
***** (ex. pour 1 mL de plasma, diviser la valeur par 5)

- Un échantillon à doser qui montre une valeur de Ct ne correspondant pas à la partie linéaire de la courbe d'étalonnage ne pourrait pas être précisément quantifié.
- Les résultats sont exprimés en UI/ml. Pour des résultats exprimés en copies/ml, diviser la valeur obtenue par 2.

Avant d'analyser et d'interpréter les résultats obtenus pour tous les échantillons à doser, commencer par vérifier les critères suivants :

Propriétés de la droite d'étalonnage:
- La valeur de la pente est dans l'intervalle [-3,6; -2,9];
- la linéarité de la droite est telle que le coefficient de corrélation R_2 se trouve dans l'intervalle [0,95; 1,00] avec idéalement $R_2 \geq 0,98$.

Contrôles négatifs:
Idéalement, la fluorescence émise par un contrôle négatif ne devrait pas couper la ligne de seuil. C'est un indicateur d'amplification aspécifique.
Note: dans le cas où un contrôle négatif dépasse le seuil, sa valeur de Ct doit être au moins 10 cycles au dessus de la valeur de Ct de l'échantillon le moins concentré en cible, dosé dans la même série d'analyse.

Validation du contrôle positif fourni dans le kit :
Tester selon les recommandations de cette notice, le contrôle positif (CONTROL + HIV-1 RNA) devrait être mesuré dans un intervalle de valeurs de 4,0±0,4 $\log_{10}$ (UI/mL) ou 3,7±0,4 $\log_{10}$ (copies/mL).*****
Note : l'absence d'amplification d'un contrôle positif laisse supposer la présence d'un inhibiteur de PCR. Il est recommandé de renouveler l'ensemble de la série d'analyse.
* Pour obtenir la valeur en copie/mL la valeur d'UI/mL est divisée par 2.

Série invalidée
L'essai est invalidé, si les propriétés de la droite d'étalonnage ne sont pas atteintes, ou si un des contrôles (négatif ou positif) n'entre pas dans les critères attendus, précédemment décrits.
Par conséquent, l'analyse entière (préparation et isolement de l'ARN des échantillons, standards et contrôles, et l'amplification) doit être renouvelée.

PERFORMANCE

Etude de spécificité

La spécificité du test GENERIC HIV CHARGE VIRALE a été évaluée sur 167 échantillons testés négatifs en ARN VIH-1 avec une technique de RT-PCR commerciale. Ces échantillons provenaient de différentes cohortes : (i) enfants (<un an) nés de mères séropositives (n=92); (ii) adultes traités en succés virologique (groupe hospitalier parisien, n=16 et cohorte MSF, Cambodge, n=59).
La spécificité de GENERIC HIV CHARGE VIRALE était de 100% (IC 95%: 97,8-100,0).

De plus, 300 échantillons d'enfants séronégatifs ont été testés avec GENERIC HIV CHARGE VIRALE; ils ont tous été trouvés négatifs.

Etude 1

- A partir de: Steegen K. et al. 2007. J.Virol. Methods; 146: 178-87.

Le test GENERIC HIV CHARGE VIRALE a été évalué sur un total de 170 échantillons de plasma (hôpital de Mombasa, Kenya) incluant un groupe de patients VIH séropositifs (n=150) et 20 échantillons de donneurs séronégatifs.

Tab.1: Répartition des patients selon la sérologie VIH et le statut vis-vis du traitement ARV, avec les résultats de la charge virale (détectable ou non) mesurée par le Test d'Acide Nucléique (TAN) de référence et GENERIC HIV CHARGE VIRALE

Groupes de patients	TAN Référence		GENERIC HIV CHARGE VIRALE	
	CV indétectable (<50 c/mL)	CV détectable	CV indétectable (<300 c/mL)	CV détectable
VIH négatif (n = 20)	20 (100%)	0 (0%)	18 (90%)	2 (10%)
VIH positif, naïf d'ARV (n = 100)	1 (1%)	99 (99%)	5 (5%)	95 (95%)
VIH positif, sous ARV (n = 50)	31 (62%)	19 (38%)	30 (60%)	20 (40%)
Total VIH positif (n = 150)	32 (21%)	118 (79%)	35 (23%)	115 (77%)

TAN Réf.= test d'Acide Nucléique pris comme méthode de référence (RT-PCR avec une détection EIA colorimétrique), CV=Charge Virale, c/mL = copies/mL, ARV=traitement antirétroviral.

- Sensibilité

Parmi les 118 échantillons présentant une CV détectée avec le test TAN de réf., 113 ont été détectés avec GENERIC HIV CHARGE VIRALE. Les cinq échantillons dont la CV était décelable par le test réf. (L.D.<50 copies/mL) qui ne l'était pas avec GENERIC HIV CHARGE VIRALE, présentaient un taux RNA VIH-1 en dessous de la limite de détection du test GENERIC HIV CHARGE VIRALE en utilisant le protocole classique (L.D. à 300 copies/mL). Ces résultats ne peuvent pas être considérés comme faux négatifs. La sensibilité est par conséquent évaluée à 100% (IC 95%: 95,9-100%).

- Spécificité
- Parmi les 20 donneurs séronégatifs, 18 étaient indétectables avec GENERIC HIV CHARGE VIRALE, aboutissant à une spécificité de 90% (IC 95%: 66,9-98,2%). L'étendue de l'intervalle de confiance pour l'étude de spécificité comparée avec le test de référence est principalement du à la faible taille de l'échantillon utilisé (n=20).
- Parmi les 31 patients séropositifs traités par ARV et présentant une CV indécelable, 27 avaient une CV en dessous de la L.D. de GENERIC HIV CHARGE VIRALE. Trois des quatre patients pour lesquels un résultat positif était obtenu avec GENERIC HIV CHARGE VIRALE, ont aussi été trouvés positifs avec un autre test TAN commercial.

- Corrélation entre GENERIC HIV CHARGE VIRALE et le test TAN pris comme méthode de référence

Les résultats obtenus avec GENERIC HIV CHARGE VIRALE étaient globalement bien corrélés avec le test référence (r = 0,939, p<0,001).

Etude 2

- A partir de: Rouet F. et al. 2007. JAIDS; 45 : 380-8.

- Quantification de sous-types VIH-1 d'un panel de référence

Tab.2: Résultats de CV ARN VIH-1 obtenus pour dix échantillons du 1er panel de référence génotypé OMS (NIBSC code: 01/466)

Sous-types /Groupe	Résultats ARN VIH-1 *($\log_{10}$ copies/mL)				
	TAN I	TAN II	TAN III	TAN IV	Generic HIV CV
A	3,38	3,55	3,06	3,57	**3,01**
B	3,15	3,53	3,20	3,40	**3,44**
C	3,43	3,59	3,07	3,44	**3,45**
D	3,50	3,81	3,49	3,71	**4,08**
AE	3,63	3,53	3,33	3,64	**3,72**
F	3,67	2,33	3,47	3,53	**3,72**
AG-GH	3,76	n.d.	3,25	3,34	**3,40**
H	4,11	2,18	3,58	3,62	**4,46**
N	3,61	n.d.	2,62	2,48	**4,01**
O	n.d.	n.d.	n.d.	2,18	**n.d.**

***** Pour chaque échantillon, les valeurs de CV ARN VIH-1 obtenues avec les quatre tests (TAN I à IV) commerciaux étaient données dans la notice du fabricant. n.d. : non détectée.

Les 8 échantillons hébergeant des VIH-1 du groupe M et l'échantillon avec un VIH-1 du groupe N étaient correctement quantifiés avec GENERIC HIV CHARGE VIRALE, comparativement aux quatre autres tests commerciaux. Comme ces autres tests, à l'exception d'un seul (TAN IV) GENERIC HIV CHARGE VIRALE n'est pas parvenu à amplifier la souche de groupe O.

- Sensibilité

Un total de 430 échantillons plasmatiques (266 souches B et 164 souches non-B) issus de patients suivis à un hôpital parisien, initialement quantifiés par un test (TAN I) commercial pris comme référence, ont été testés avec GENERIC HIV CHARGE VIRALE.
Parmi ces 430 échantillons, le test GENERIC HIV CHARGE VIRALE a été en mesure d'en quantifier 427, aboutissant à une sensibilité globale de 99,3% (IC 95%: 98,0-99,9%). Les trois souches non détectées par GENERIC HIV CHARGE VIRALE étaient représentées par des virus B.

• Performance de GENERIC HIV CHARGE VIRALE comparativement à d'autres Tests d'Acide Nucléique (TAN)

Tab.3: Comparaison des résultats de quantification ARN VIH-1 (en log_{10} copies/mL) entre GENERIC HIV CHARGE VIRALE et un test commercial pour 430 échantillons cliniques (un seul site hospitalier)

Echantillons VIH-1	Sous-types B	Sous-types non-B
N (430)	263	164
Corrélation R^2	0,8920 (*P*<0,001)	0,8922 (*P*<0,001)
Différence globale (δ)*	+0,10 log_{10}/mL	+0,23 log_{10}/mL
δ log_{10} ± 2.SD (n , %)	10 (3,8%)	7 (4,3%)
Distribution homogène (n, %) **	253 (96,2%)	157 (95,7%)

* Différence calculée entre les valeurs (log_{10} copies/mL) obtenues avec GENERIC HIV CHARGE VIRALE et un test TAN pris comme référence.
** Distribution homogène des valeurs de CV ARN VIH-1 à l'intérieur de l'IC à 95%.

Tab.4: Comparaison des résultats de quantification ARN VIH-1 (en log_{10} copies/mL) entre GENERIC HIV CHARGE VIRALE et deux autres tests commerciaux (TAN I et II) pour 380 échantillons cliniques issus de dix pays différents

Echantillons/ Pays	Tests/ TAN I	Tests/ TAN II
N (380)	271†	109††
Corrélation R^2	0,8668 (*P*<0,001)	0,8932 (*P*<0,001)
Différence globale (δ)*	+0,21 log_{10}/mL	+0,35 log_{10}/mL

† Les 271 échantillons sont issus de 7 pays différents: France (n=88), Zimbabwe (n=52), Maroc (n=50), République centrafricaine (n=25), Cambodge (n=24), Thaïlande (n=10) et Madagascar (n=22).
†† Les 109 échantillons sont issus de 3 pays différents: Côte d'Ivoire (n=69), Argentine (n=30) and Cameroun (n=10).
* Différence calculée entre les valeurs (log_{10} copies/mL) obtenues avec GENERIC HIV CHARGE VIRALE et les deux tests TAN pris comme référence.

Etude 3

• A partir de: Rouet F. et al. 2010. J.Virol. Methods; 163:253-7.

Une étude comparant la performance de trois tests de quantification de la CV ARN VIH-1 (GENERIC HIV CHARGE VIRALE *versus* deux autres tests TAN I et II commerciaux) a été effectuée sur 160 échantillons de plasma issus de 160 femmes enceintes séropositives, naïves de traitement ARV et incluses dans l'étude Kesho Bora, programme de PTME conduit dans trois pays africains (Burkina Faso, Kenya et Afrique du Sud).

La corrélation entre les trois tests a été évaluée pour la quantification de la CV ARN VIH-1 des échantillons incluant des souches prédominantes de sous-types A1 et C, et des formes recombinantes CRF02_AG et CRF06_cpx.

Une bonne concordance de résultats a été observée entre les tests de CV ARN VIH-1. Néanmoins, neuf souches (9/160, 5,6%) détectées avec GENERIC HIV CHARGE VIRALE n'avaient pas été détectées ni avec le test TAN I (n=7) ni avec TAN II (n=2). Une seule souche (0,6%) n'était pas décelable avec GENERIC HIV CHARGE VIRALE.

BIBLIOGRAPHIE

Barre-Sinoussi, F. et al. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science **220(4599):**868-71.
Larder, B. A., and S. D. Kemp. 1989. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). Science; **246:**1155-8.
Japour, A. et al. 1991. Detection of human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates with reduced sensitivity to zidovudine and dideoxyinosine by RNA-RNA hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; **88:**6320-4.
CDC/NIH, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 3rd Edition, HHS Publication No. (CDC) 93-8395, JY Richmond and RW McKinney (eds.), U.S. Government Printing Office, Washington, DC (1993).
Ho, D. D.et al. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Nature; **373:**123-6.
Mellors, J. W. et al. 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. Science **272:**1167-70.
Hughes, M. D. et al. 1997. Monitoring plasma HIV-1 RNA levels in addition to CD4+ lymphocyte count improves assessment of antiretroviral therapeutic response. Ann. Intern. Med. **126:**929-38.
Mellors, J. W. et al. 1997. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. Ann. Intern. Med. **126:**946-54.
O'Brien, W. A. et al. 1997. Changes in plasma HIV RNA levels and CD4+ lymphocyte counts predict both response to antiretroviral therapy and therapeutic failure. Ann. Intern. Med. **126:**939-45.
Shafer, R. W. et al. 1998. Multiple concurrent reverse transcriptase and protease mutations and multidrug résistance of HIV-1 isolates from heavily treated HIV-1 infected patients. Ann. Intern. Med.**128:**906-11.
Rouet, F. et al. 2005. Transfer and Evaluation of an Automated, Low-Cost Real-Time Reverse Transcription-PCR Test for Diagnosis and Monitoring of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in a West African Resource-Limited Setting. J. Clin. Microbiol. **43:** 2709-17.
Fiscus, S.A. et al. and the Forum for Collaborative HIV Research Alternative Viral Load Assay Working Group. 2006. HIV-1 Viral Load Assays for Resource-Limited Settings. PLoS Medicine; **3:**1-8.
Rouet, F., and C. Rouzioux. 2007. The measurement of HIV-1 viral load in resource-limited settings: how and where? Clin. Lab. **53(3-4):**135-48.
Rouet, F. et al. 2007. Impact of HIV-1 Genetic Diversity on Plasma HIV-1 RNA Quantification: Usefulness of the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA Second-Generation Long Terminal Repeat-Based Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Test. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. **45(4):**380-8.
Steegen, K. et al. 2007. Evaluation of two commercially available alternatives for HIV-1 viral load testing in resource-limited settings. J.Virol. Methods; **146:** 178-87.
Rouet, F. et al. 2010. Comparison of the Generic HIV Viral Load assay with the Amplicor HIV-1 Monitor v1.5 and Nuclisens HIV-1 EasyQ v1.2 techniques for plasma HIV-1 RNA quantitation of non-B subtypes: The Kesho Bora preparatory study. J.Virol. Methods; **163:**253-7.

SYMBOLES UTILISES SUR LES ETIQUETTES

	Consulter la notice d'utilisation		Code du lot
	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Limites de température
	Pour évaluation de performance IVD uniquement		Utiliser jusqu'au
	Référence du catalogue		Fabricant
	Suffisant pour		

MARQUES

QIAGEN® et QIAamp® (QIAGEN Group); TaqMan® (Roche Molecular Systems, Inc); FAM™ et ROX™ (Applied Biosystems, Inc)

AVIS À L'ACHETEUR: LICENCE LIMITEE

La sonde MGB contenue dans ce produit est couvert par un ou plusieurs des brevets américains suivants et des brevets correspondants en dehors des Etats-Unis: 5.801.155 et 6.084.102 et est vendue sous une licence du groupe ELITech. L'achat de ce produit inclut une licence pour utiliser uniquement cette quantité de produit, seulement pour un usage personnel de l'acheteur dans le domaine du diagnostic in vitro humain (conformément aux lois de la FDA et autres exigences réglementaires) et ne peut être utilisé pour toute autre exploitation commerciale, y-compris, sans limitation, le reconditionnement ou la revente sous toute autre forme.

BIOCENTRIC
Immeuble Horus
276 chemin de Roumpinas
83150 Bandol – France
Tel: +33 (0)4 94 29 06 30 / Fax: +33 (0)4 94 29 06 31
e-mail : biocentric@biocentric.com